

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
22. März 2001 (22.03.2001)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 01/19183 A2

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: **A01K 67/027**

(74) Anwalt: **BAUMBACH, F.**; Robert-Rössle-Strasse 10,
13125 Berlin (DE).

(21) Internationales Aktenzeichen: **PCT/DE00/03164**

(22) Internationales Anmeldedatum:
12. September 2000 (12.09.2000)

(25) Einreichungssprache: **Deutsch**

(26) Veröffentlichungssprache: **Deutsch**

(30) Angaben zur Priorität:
199 44 402.1 16. September 1999 (16.09.1999) **DE**

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von
US): **BIOS BIOTECHNOLOGIE SCHÖNOW GMBH**
[DE/DE]; Bernauer Chaussee 10, 16321 Schönow (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AG, AL, AM, AT,
AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU,
CZ, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR,
HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR,
LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ,
NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM,
TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (regional): ARIPO-Patent (GH,
GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eura-
sisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),
europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI,
FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI-Patent
(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE,
SN, TD, TG).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): **MÜLLER, Karin**
[DE/DE]; Schalauer Strasse 5a, 13125 Berlin (DE).
MARKGRAF, Karin [DE/DE]; Fritz-Kirsch-Zeile 18,
12459 Berlin (DE). **SCHMIDT, Michael, F., G.** [DE/DE];
Beelitzer Strasse 1, 14554 Seddiner See (DE). **HER-**
рман, Andreas [DE/DE]; Wilhelm-Wolff-Strasse 25a,
13156 Berlin (DE).

Veröffentlicht:

— Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu
veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes, und der anderen
Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on
Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe
der PCT-Gazette verwiesen.

A2

(54) Title: **DEVELOPMENT OF AN EFFECTIVE GENE TRANSFER TECHNIQUE FOR INTRODUCING FOREIGN DNA
INTO SPERM CELLS**

(54) Bezeichnung: **ENTWICKLUNG EINER EFFEKTIVEN GENTRANSFERTECHNIK FÜR DAS EINSCHLEUSEN VON
FREMD-DNS IN SPERMIENZELLEN**

(57) Abstract: The invention relates to the development of an effective gene transfer technique for introducing foreign DNA into
sperm cells using virosomal carriers. The invention can be used in the areas of agriculture and biotechnology.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft die Entwicklung einer effektiven Gentransfertechnik für das Einschleusen von
Fremd-DNS in Spermienzellen mittels virosomaler Carrier. Anwendungsgebiete der Erfindung sind die Landwirtschaft und die Bi-
otechnologie.

WO 01/19183

Entwicklung einer effektiven Gentransfertechnik für das Einschleusen von Fremd-DNS in Spermienzellen

Beschreibung

Die Erfindung betrifft die Entwicklung einer effektiven Gentransfertechnik für das Einschleusen von Fremd-DNS in Spermienzellen mittels virosomaler Carrier. Anwendungsgebiete der Erfindung sind die Landwirtschaft und die Biotechnologie.

Bezüglich der Transfektion von Spermien und deren Vektorfunktion für den Transport genetischen Materials in die Eizelle gibt es nur wenige Veröffentlichungen. Die Nutzung von Spermien als Überträger von Fremd-DNS in eine Eizelle wurde erstmalig von Lavitrano et al. (1989) bei der Maus beschrieben. 30% der erzeugten Nachkommen enthielten die Fremd-DNS. Spermien binden nach Lavitrano et al. (1992) die negativ geladene Plasmid-DNA über 30–35 kD Proteine nach einfacher Inkubation. Das von den Autoren 1989 beschriebene Verfahren konnte von anderen Gruppen nicht reproduziert werden (s. Bachiller et al., 1991). Letztere nutzten Liposomen-DNA-Komplexe (Lipofectin) zur Transfektion von Mäusespermien (80% Transfektionsrate). Bei normaler Befruchtungsrate konnten jedoch keine transgenen Nachkommen erzeugt werden.

Tsai et al. (1997) gelang nach Elektroporation von Spermien mariner Mollusken die Einschleusung fremder Plasmid-DNS und deren erfolgreiche Übertragung in die Eizelle bei einer Fertilisationsrate von >90%. 65% der Larven verfügten über die Fremd-DNS. Diese Elektroporation führt bei Säugerspermien zur Zerstörung des für den natürlichen Befruchtungsvorgang (also ohne intrazytoplasmatische Spermieninjektion ins Ei = ICSI) notwendigen Akrosoms (Nakanishi und Iritani, 1993).

Zur Virosomen-Spermien-Fusion gibt es 2 Arbeiten: Nussbaum et al. (1993) zeigten aus medizinischer Sicht (HIV usw.), daß Viren (Sendai, Influenza, Semliki forest) mit Bullenspermien über Rezeptormoleküle fusionieren können. Nussbaum und Loyter (1995) nutzten bereits rekonstruierte Virushüllen (Sendai), um den darin eingebauten Fluoreszenzfarbstoff Calcein in Bullenspermien zu bringen. Bezüglich der Motilität der Spermien gab es jedoch nach der Fusion drastische Einschränkungen. Bei einem Virus-Partikel/Spermien-Verhältnis >10:1 sank die Motilität dramatisch. Darüber hinaus gibt es keine Angaben zum Prozentsatz fusionierter Spermien oder zum Targeting, da sich der benutzte photometrische Fusionsassay nur auf die Gesamtsuspension bezieht.

Die Nutzung von Virosomen oder Liposomen mit virosomalen Fusionsproteinen für einen gezielten Transfer verschiedenster Substanzen in Zellkulturen bzw. bestimmte Zielzellen in vivo (Targeting) wird von immer mehr Arbeitsgruppen angestrebt (US 5.683.866, Schoen et al., 1999). Bisher sind aber praktisch verwertbare Ergebnisse noch ausgeblieben.

Aufgabe der Erfindung war es deshalb, eine neue Gentransfertechnik zu entwickeln, die das Einschleusen von Fremd-DNS in Spermienzellen von Nutztieren, wie z.B. Bulle und Schafbock und deren nachfolgende Nutzung als Vektoren zur Erstellung transgener Embryonen gestattet. Das Verfahren soll die Eigenschaft viraler Bindungs- und Fusionsproteine, nämlich ein Verschmelzen von Lipidmembranen zu vermitteln, nutzen.

Erfindungsgemäß realisieren DNS-beladene virosomale Carrier die Transfektion der Spermienzellen.

In einer ersten Phase wird die Herstellung von Virosomen und die Optimierung der Rekonstitutionsbedingungen hinsichtlich der Fusionsaktivität mit Spermienzellen standardisiert. Diese Arbeiten stellen den Schwerpunkt der Erfindung dar. Die detailliert dargelegten Versuche sind geeignete Ansätze bei der Realisierung (vgl. Ergebnisse), wobei insbesondere die Reproduzierbarkeit der erarbeiteten Protokolle ein Hauptproblem darstellten, da die Vermehrung der benötigten Viren im Vorfeld der Virosomenherstellung offenbar zu relativ unterschiedlichen Populationen führt. Eine Angleichung der Präparationen wird erfindungsgemäß einerseits durch definierte und geeignete Zugabe exogener Lipide erreicht, andererseits wurden geeignete Präparationen durch die Optimierung der Lagerung gesplitteter Proben besser ausgenutzt.

Der Nachweis der Erfindung erfolgte unter Nutzung des Markergens für das sogenannte 'Grün Fluoreszierende Protein' (GFP), das sich als vorteilhaft für den Einbau eines Testgens in die Virosomen erwies. Die Transfektionseffizienz einiger Virosomenchargen konnte so parallel zu den Fusionsversuchen mit Spermienzellen auch anhand der Expression des GFP in einer CV-1-Zelllinie (Affennierenzellen) bewertet werden. Da Spermien keine Expression zeigen, müssen zum Nachweis der erfolgreichen Fusion mit Virosomen hier weitere Tests, z.B. ein Membran-Fusionstest auf Rhodamin-PE-Basis (vgl. Ausführungsbeispiel) genutzt werden.

Es wurden mehrere Virusstämme getestet, Sendai- und Influenza-Viren haben sich als bevorzugt erwiesen. Ein Influenzavirusstamm wurde bevorzugt ausgewählt. Ein bevorzugtes Lipidgemisch ist 3.5 μmol Phosphatidylethanolamin (PE), 36 μmol Phosphatidylcholin (PC), 62 μmol Sphingomyelin (SM), 62 μmol Cholesterol (C) für ein Viruskonzentrat mit einem Proteingehalt von ca. 25 – 30 mg. In Auswertung der Ergebnisse wurde der Schwerpunkt weiter auf die reproduzierbare Herstellung dieser Virosomen gelegt, indem möglichst einheitliche Viruspräparationen erzeugt und genutzt wurden.

Die Verwendung von Lipiden zur Herstellung von Virosomen zur Transfektion von Spermien wird mit der vorliegenden Erfindung erstmalig und mit Vorteil realisiert. Auch der Einsatz von Influenzaviren zum Aufbau von Virosomen gemäß der Erfindung ist absolut neu.

Parallel wurde die Spermienaufbereitung variiert, um die beste Überlebensrate bzw. später Befruchtungsrate nach Fusion zu erreichen.

Ergebnisse

Für die Virosomenherstellung wurden zwei verschiedene Virusstämme getestet: Sendai-Viren und Influenza-Viren. Beide Viren und damit auch die daraus gewonnenen Virosomen haben den Vorteil, daß sie mit vielen Zellarten unterschiedlicher Spezies fusionieren, einschließlich Bullenspermienzellen.

Zur Herstellung der Virosomen wurde die Virushülle von dem viralen Erbgut abgetrennt. Die aufgelösten Virushüllbestandteile enthalten sowohl Lipide als auch die für die Fusion wichtigen Proteine. Unter Zusatz verschiedener exogener Lipide wurden Virosomen konstruiert, die entweder Rhodamin-PE als Membranmarker oder das eingebaute GFP-Plasmid enthalten, das ein grünes Fluoreszenzprotein kodiert.

Als Kontrolle, ob das GFP exprimiert wird, werden die Virosomen auch auf CV-1 Zellen (Affennierenzellen) getestet. Für die spätere anwendungsreife Nutzung des virosomalen Carriers sollen andere Genkonstrukte verwendet werden.

Tabelle 1: Darstellung der Ergebnisse, die mit verschiedenen Varianten von Virosomen erreicht wurden.

Viren für Virosomenherstellung	Sendai	Sendai	Influenza	Influenza	Influenza	Influenza
Lipidzusatz für die Virosomenherstellung	Cholesterol, Sphingomyelin, Phosphatidylcholin, Phosphatidylethanolamin	ohne	Cholesterol, Sphingomyelin, Phosphatidylcholin, Phosphatidylethanolamin	DOTAP, Phosphatidylethanolamin	Phosphatidylethanolamin	ohne
Fusionsrate	90 - 95 %	5 - 10 %	90 - 95 %	90 %	85 - 90 %	65 %
Motilität	< 5 %	-	90 %	50 - 60 %	90 %	85 %
Fusionsregion an den Spermienzellen	am gesamten Spermium	-	am gesamten Spermium	gesamter Spermien-schwanz, nicht am Kopf	Kopf, Mittelstück des Schwanzes	unterschiedlich
CV-1 Zellen, die GFP exprimieren (pro Zellkulturschale, mit ca. $2 \cdot 10^6$ Zellen)	2000 - 3000	100 - 300	10 - 20	10 - 20	10 - 15	3 - 5

Sendai-Virosomen:

Virosomen aus Sendai Viren zeigten eine hohe Fusionsrate mit den Spermien. Die Fusion kann bei pH 7 durchgeführt werden, was für die Zellen vorteilhaft ist, da keine unphysiologische pH-Wert-Erniedrigung nötig ist. Rund 90 - 95 % der Spermien, die mit Rhodamin-PE-markierten Virosomen behandelt wurden, zeigten danach ebenfalls diese Markierung als Zeichen für die Membranverschmelzung. Die Beweglichkeit und die Lebensfähigkeit dieser Spermien jedoch wurden durch die Sendai-Virosomen stark eingeschränkt. Weniger als 5 % der Spermien zeigten nach der Fusion mit den Sendai-Virosomen noch gute Motilität und Vitalität. Der Großteil der fusionierten Spermien war eingeschränkt bzw. nicht beweglich. Teilweise wurde durch die Sendai-Virosomen das Akrosom der Spermien beschädigt. Ein intaktes Akrosom, gute Beweglichkeit und das mit großer Spermienanzahl sind aber Voraussetzungen für eine erfolgreiche Befruchtung.

Auch andere Varianten (Eliminierung von Virusprotein) und kürzere Inkubationszeiten veränderten nicht die Toxizität dieser Virosomen.

Tabelle 2: Darstellung der Ergebnisse, die mit verschiedenen Varianten von Virosomen erreicht wurden (jeweils 3 bzw. 4 verschiedene Präparationen pro Variante)

Viren für Virosomenherstellung	Influenza	Influenza
Lipidzusatz für die Virosomenherstellung	Cholesterol, Sphingomyelin, Phosphatidylcholin, Phosphatidylethanolamin	Phosphatidylethanolamin (PE), SAINT-PE
Fusionsrate [%]	67/96/94/91	84/93/92
Vitalität [% vitale]	100/100/98/93	94/100/100
% vitale nicht fusionierte Spermien	13/0/0/0	1/0/4

Das bereits benannte Lipidgemisch wurde als Zusatz bei der Virosomenherstellung im Vergleich zu einem Gemisch aus jeweils 100 µmol Phosphatidylethanolamin (PE) und 100 µmol SAINT-PE für ein Viruskonzentrat mit einem Proteingehalt von ca. 25 – 30 mg genutzt. Die Fusion der Spermienzellen mit den Virosomen wurde nach Selektion der motilen Zellen durch eine geeignete schonende Verschiebung des pH-Wertes auf 5 und anschließende Reneutralisierung erreicht. Die Vitalität der Spermien wurde nach der Fusion mittels Rhodamin 123 getestet, einem Fluoreszenzmarker für mitochondriale Aktivität. Parallel erfolgte die Darstellung der Fusion mit den Virosomen mit Hilfe des in die Virosomenmembran eingebauten Rhodamin-PE (wie bereits beschrieben). Beide Lipidzusätze erbrachten eine reproduzierbar hohe Fusionsrate unter Erhalt der Spermiovitalität. Bei Nutzung der Lipidmischung (Cholesterol, Sphingomyelin, Phosphatidylcholin, Phosphatidylethanolamin) wurde mikroskopisch mit drei von vier Virosomenpräparationen kein vitales Spermium beobachtet, das nicht auch fusioniert war. Damit ist mit hoher Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen, daß nicht fusionierte/transgene Spermien zur Befruchtung gelangen.

Durch die Erfindung wurden grundlegende Resultate für die Nutzung eines virosomalen Carriers geschaffen.

Die Vorteile der neuen Methode liegen vor allem darin:

- Eine Transfizierung fast aller lebenden Spermien einer Probe wird erreicht
- Die Befruchtungsfähigkeit wird ohne zusätzliche Manipulation erhalten
- Ein Targeting an bestimmte Spermienregionen ist möglich
- Es können genügend große DNA-Mengen (Virosomengröße oder Anzahl/Spermium) eingebracht werden.

Die Erfindung wird nachfolgend durch ein weiteres Ausführungsbeispiel näher erläutert.

Influenza-Virosomen:

Influenza-Virus und die daraus gewonnenen Virosomen wurden bei pH 7 an Bullenspermien gebunden. Erst eine kurzzeitige pH-Erniedrigung auf pH 5 löste dann die Fusion aus. Anschließend wurde der pH der Spermiesuspension wieder auf pH 7 reneutralisiert, damit die Spermienzellen durch die pH-Änderung nicht unnötigem Stress ausgesetzt werden. Die Fusionsrate lag zwischen 60 - 90 % in Abhängigkeit von den zugesetzten Lipiden. Es wurden Virosomen aus zwei unterschiedlichen Influenza-Stämmen (APR 8, X-31) hergestellt. Ein Einfluß auf die Fusionsrate konnte nicht festgestellt werden. Die Toxizität der Influenza-Virosomen war deutlich geringer als die der Sendai-Virosomen. Je nach Lipidzusammensetzung der Virosomen zeigten die Bullenspermien Beweglichkeiten von 50 - 90 %. Die höchste Fusionsrate mit minimaler Toxizität erreichten wir mit Influenza-Virosomen, denen ein Lipidgemisch aus vier verschiedenen Lipiden (Cholesterol, Sphingomyelin, Phosphatidylcholin, Phosphatidylethanolamin) zugesetzt wurde. Bei den Virosomen mit diesem Lipidgemisch zeigte sich auch, daß die Fusion am gesamten Spermium stattfindet. Influenza-Virosomen, die mit anderen Lipiden hergestellt wurden, wiesen unterschiedlich bevorzugte Fusionsregionen an den Spermienzellen auf. Für das Einschleusen in die Rindereizelle durch Befruchtung ist es Voraussetzung, daß das Genkonstrukt im Kopf oder Hauptstück des Schwanzes der Bullenspermienzellen lokalisiert ist. Influenza-Virosomen, die mit diesem Lipidgemisch (Cholesterol, Sphingomyelin, Phosphatidylcholin, Phosphatidylethanolamin) hergestellt wurden, erfüllen die Voraussetzungen, die eine weitere Befruchtung möglich machen.

Nachweis der Fusion mit Spermien erfolgt mikroskopisch über:

- Rhodamin-Phosphatidylethanolamin (Rh-PE) in der Virosomenmembran, eingebaut bei der Rekonstruktion: Gebundene Virosomen sind im Fluoreszenzmikroskop als rote Spots sichtbar. Nach Fusion zeigen fusionierte Membranareale infolge des Fluoreszenzdequenching (üblicher Fusionsassay) eine leuchtend rote kontinuierliche Fluoreszenz.
- Der Fluoreszenzfarbstoff Hoechst 33342 (H 342), gebunden an das GFP-Plasmid vor der Rekonstruktion der Virosomen: Überschüssiger Farbstoff wird durch Waschung von den Virosomen entfernt. Der fluoreszierende DNS-Farbstoff ist in der Lage Zellmembranen zu permeieren. Bei Vorhandensein von überschüssigem Farbstoff wären daher alle Zellen gefärbt. Bei Färbung einzelner Zellen muß davon ausgegangen werden, daß h 342 über die Virosomenfusion in die Zelle gelangt ist.

Im Vergleich zur radioaktiven Markierung der Fremd-DNS gestatten die fluoreszenzoptischen Assays die Einzelzellanalyse.

Literatur:

- Schoen, P. et al. (1999) Gene Therapy 6, 823-832
Tsai, H.-J. et al. (1997) Transgenic Res. 6, 85-95
Bachiller, D. et al. (1991) Molec. Reprod. Dev. 30, 194-200
Lavitrano, M. et al. (1989) Cell 57, 717-723
Lavitrano, M. et al. (1992) Molec. Reprod. Dev. 31, 161-169
Nakaanishi, A. et al. (1993) Molec. Reprod. And Dev. 36, 258-261
Nussbaum, O. et al. (1993) Exp. Cell Res. 206, 11-15
Nussbaum, O. et al. (1995) Arch. of Virology 140, 1613-1622

Patentansprüche

1. Befruchtungsfähige transgene Spermien, umfassend Säugetierspermien und Fremdgenkonstrukte.
2. Transgene Spermien nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Säugetierspermien von Nutztieren, vorzugsweise Rindern und Schafen, stammen.
3. Transgene Spermien nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass die Fremdgenkonstrukte in Form von Virosomen als virosomale Carrier vorliegen.
4. Transgene Spermien nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, dass die Virosomen aus Bestandteilen der Hülle eines Virus bestehen sowie ein Lipidgemisch aus einem Steroid, vorzugsweise Cholesterol, und mindestens einem amphiphilen Lipid, vorzugsweise Sphingomyelin, Phosphatidylcholin und/oder Phosphatidylethanolamin und/oder DOTAP und/oder SAINT-PE aufweisen.
5. Transgene Spermien nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, dass Lipid- und/oder Proteinbestandteile aus der Hülle von Sendai- oder Influenza-Viren verwendet werden.
6. Transgene Spermien nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, dass die Fremdgenkonstrukte Nachweisgenkonstrukte, vorzugsweise für GFP oder Luciferase, sind.
7. Transgene Spermien nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, dass die Fremdgenkonstrukte Gene für Proteine sind, die pharmazeutisch benutzt werden.
8. Verfahren zur Herstellung von befruchtungsfähigen transgenen Spermien, dadurch gekennzeichnet, dass mit Fremdgenkonstrukten Virosome hergestellt und mit Säugetierspermien fusioniert werden.
9. Verfahren nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, dass die Virosomen aus Sendai- oder Influenza-Viren stammen.